

herb of knotweed and water pepper. Biologically active agents flavonoids, K₁ vitamin, macro-, microcells and amino acids are determined.

Keywords: herb of knotweed and water pepper, leaves of a nettle, amino acids, chromatography, HPLC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веденкина, Ю.И. Разработка и стандартизация лекарственного средства растительного происхождения, рекомендуемого при заболеваниях пародонта / Ю.И. Веденкина // Автореферат дис. ... канд. фарм.наук. – М. – 2009. – С. 3 – 4.

2. Юнусходжаева, Н.А. Гемостатические свойства сбора из лекарственных растений горца птичьего, горца перечного и крапивы / Н.А. Юнусходжаева, Ф.А. Сайдалиева, Д.С. Казанцева // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2012. – №4. – С. 76 – 79.

3. Кавтарадзе, Н.Ш. Хроматоспектрофотометрический метод количественного определения витамина K₁ в листьях *Urtica dioica* L / Н.Ш. Кавтарадзе, М.Д. Алания // Раст. ресурсы. – Москва, 2002. – Т.38. – №4. – С. 118 – 120.

4. Николаева, Г.Г. Фенольные соединения различных видов *Polygonum* / Г.Г. Николаева, М.В. Лаврентьева, И.Г. Николаева // Химия природ. соедин. – Ташкент, 2009. – №5. – С. 616 – 617.

5. Губин, К.В. Изучение химического состава надземной части *Urtica Cannabina* L.

Флоры Сибири / К.В. Губин, М.А. Ханина // Химия раст. сырья. – 2009. – № 3. – С. 89 – 92.

6. Юнусходжаева, Н.А. Разработка ВЭЖХ методики определения витамина K₁ в травах горца птичьего и перечного / Н.А. Юнусходжаева, Х.Н. Бекчанов, В.Н. Абдуллабекова // Фармацевтический журнал. – Ташкент, 2006. – № 4. – С. 37 – 40.

7. Бубенчикова, В.Н. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, И.П. Дроздова // Хим. фарм.журн. – 2004. – №4. – С. 24 – 25.

8. Yunuskhodjaeva, N.A. Licviridine and cynnarozide from *Polygonum aviculare* L / N.A. Yunuskhodjaeva, V.N. Abdullabekova, K.A. Eshbakova // 7-th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds: Abstracts. – Tashkent, Uzbekistan, 2007. – P. 353.

9. Девени, Я. Гергей. Аминокислоты, пептиды и белки / Я. Девени // Издательство «Мир» Москва, 1976. – С. 355.

10. Государственная фармакопея СССР. – XI изд. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. – С. 200 – 217.

Адрес для корреспонденции:

100015, Узбекистан,
г. Ташкент, ул. Айбека, 45,
Ташкентский фармацевтический институт,
e-mail: yunuskhodjaeva-n@mail.ru,
Юнусходжаева Н.А.

Поступила 14.03.2014 г.

С.Л. Федорук¹, Т.В. Трухачева¹, С.Н. Соколов¹, К.А. Фроленков¹, В.П. Хейдоров²

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА Е6 В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА

¹РУП «Белмедпрепараты», г. Минск

²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Методом спектрофотометрии в видимой и УФ-областях были проанализированы различные образцы, полученные на основе диметилового эфира хлорина е6 (диметил 2-[(7S, 8S)-3-карбокси-7-(2-карбоксиэтил)-13-этилен-18-этил-7,8-дигидро-2,8,12,17-тетраметил-21Н, 23Н-порфин-5-ил] уксусная кислота) и различных образцов поливинилпирролидона. Было изучено влияние соотношения фотосенсибилизатор-поливинилпирролидон в различных буферных растворах на спектральные свойства диметилового эфира хлорина е6. Полученные спектры также сравнивались со спектрами хлорина е6 в присутствии поливинилпирролидона. Доказано, что моляр-

ная масса высокомолекулярного соединения слабо влияет на спектральные свойства полученного вещества. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении эффекта ди- и олигомеризации молекул фотосенсибилизатора в присутствии высокомолекулярного компонента, а также об образовании комплекса данного соединения с макромолекулами поливинилпирролидона. Проведенные исследования являются перспективными для дальнейших исследований и получения лекарственных средств на основе диметилового эфира хлорина еб и поливинилпирролидона.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, УФ-видимая спектрофотометрия, диметиловый эфир хлорина еб, поливинилпирролидон.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых противоопухолевых лекарственных средств является одной из приоритетных задач фармацевтической промышленности Беларуси. Ведутся работы по разработке не только классических противораковых лекарственных средств, таких как цитостатические и цитотоксические, но и препаратов на основе фотосенсибилизаторов. На РУП «Белмедпрепараты» успешно производится лекарственное средство Фотолон, которое имеет государственную регистрацию не только в Республике Беларусь, но и в других странах. Фотолон представляет собой молекулярный комплекс хлорина еб и поливинилпирролидона [1, 2]. Данное лекарственное средство эффективно при лечении онкологических, офтальмологических и некоторых других заболеваний [3, 4]. Тем не менее поиски других, более эффективных, лекарственных средств продолжаются. Так, сотрудниками РУП «Белмедпрепараты» был синтезирован диметиловый эфир хлорина еб (ДМЭ Хеб), который ввиду своей более высокой гидрофобности по сравнению с хлорином еб обладает лучшей биодоступностью и может усилить эффективность лекарственных средств на основе данного соединения. Большой потенциал применения ДМЭ Хеб подтверждается в некоторых работах [5 – 7]. Однако в настоящее время нет информации о комплексообразовании данного соединения с высокомолекулярными соединениями, в частности с поливинилпирролидоном (ПВП), который хорошо себя зарекомендовал как вспомогательное вещество в различных лекарственных средствах. Целью настоящего исследования было изучение спектральных свойств образцов на основе ДМЭ Хеб с ПВП. Результаты данного исследования могут быть использованы для разработки нового лекарственного средства на основе фотосенсибилизатора ДМЭ Хеб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Исследованиям подвергался образец ДМЭ Хеб, синтезированный на РУП «Белмедпрепараты».

Для проведения анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяли следующие реактивы: вода для хроматографии, полученная с помощью системы Millipore Milli-Q (Millipore, Milford, MA, США), ацетонитрил для градиентной хроматографии (Merck, Германия), метанол (Merck, Германия), трифторуксусная кислота (AppliChem, Германия).

Для исследований использовали образцы ПВП различных производителей с различными молярными массами («Синтвитта» с молярной массой 12600 ± 2700 , Пласдон C12 (K=12, среднемассовая молярная масса (Mw) составляет 4000), Пласдон K17 (K=17, Mw=10000) и Пласдон C25 (K=25, Mw=30000) фирмы ISP (США)).

При приготовлении исследуемых растворов использовали трис(гидроксиметил)ами-нометан (Sigma-Aldrich, США), натрия гидроксид (Merck, Германия), кислоту хлористоводородную (Sigma-Aldrich, США), калия дигидрофосфат (AppliChem, Германия).

Подготовка анализируемых образцов. Для исследования чистоты полученного образца ДМЭ Хеб методом ВЭЖХ около 2,0 мг вещества помещали в мерную колбу с затемненным стеклом объемом 20 мл, растворяли в 10 мл метанола для градиентной хроматографии, доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH=6,4 осуществляли путем разбавления точной навески калия дигидрофосфата с последующим доведением pH до $6,4 \pm 0,05$ разведенным раствором натрия гидроксида. Для приготовления двух других буферных растворов предварительно готовили раствор

24,3 г/л трис(гидроксиметил)аминометана в воде (концентрированный раствор трис(гидроксиметил)аминометана). Для получения трис(гидроксиметил)аминометан-буферного раствора pH=7,4 (буферного раствора Трис 7,4) 25 мл концентрированного раствора трис(гидроксиметил)аминометана смешивали с 40 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводили объем раствора до 500 мл. Трис(гидроксиметил)аминометан-буферный раствор pH=8,5 (буферный раствор Трис 8,5) готовили путем смешивания 25 мл концентрированного раствора трис(гидроксиметил)аминометана с 12 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, затем доводили объем раствора до 500 мл.

Образец ДМЭ Хеб растворяли в 0,1% растворе натрия гидроксида с получением раствора с концентрацией 0,1 мг/мл (концентрированный раствор ДМЭ Хеб).

Образцы ПВП растворяли в воде с получением растворов с концентрацией 0,1; 1,0; 10; 100; 500 мг/мл (концентрированный раствор ПВП с соответствующей концентрацией).

Для получения испытуемого раствора 1,0 мл концентрированного раствора ДМЭ Хеб и 1,0 мл концентрированного раствора ПВП с соответствующей концентрацией помещали в мерную колбу объемом 10 мл, доводили объем раствора до метки буфер-

ным раствором. Для сравнения поведения исследуемых образцов при различных pH использовались различные буферные растворы, приготовление которых указано выше.

Оборудование. В работе использован УФ-вид спектрофотометр UV-2401 фирмы Shimadzu (Япония). Спектр снимали от 190 до 800 нм. В кювету сравнения помещали соответствующий буферный раствор.

Для исследования чистоты полученного фотосенсибилизатора использовали жидкостный хроматограф фирмы Waters (США), включающий насос Waters600 и фотодиодную матрицу Waters2996. Длина волны детектирования – 407 нм. Для получения более полной информации о самом исследуемом образце, а также о возможных примесях, спектр регистрировали в диапазоне от 350 до 700 нм.

Для разделения использовали хроматографическую колонку размерами 100x4,0 мм с монолитной неподвижной фазой Chromolith RP-18, эндкепированной (Merck, Германия). Градиентное элюирование проводили при температуре 25±1°C элюентами, включающими 0,08% раствор трифторуксусной кислоты – подвижная фаза А (ПФ А) и ацетонитрил для градиентной хроматографии – подвижная фаза В (ПФ В) (таблица 1). Объем петли ручного инжектора – 20 мкл.

Таблица 1 – Условия градиентного элюирования анализируемых соединений

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0–20	55→0	45→100
20–23	0	100
23–24	0→55	100→45
24–28	55	45

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный на РУП «Белмедпрепараты» фотосенсибилизатор ДМЭ Хеб предварительно подвергали исследованию чистоты методом ВЭЖХ. В результате анализа была получена хроматограмма (рисунок 1). Хроматографическая чистота образца ДМЭ Хеб составляла 99,64%.

При изучении спектральных свойств ДМЭ Хеб были видны существенные отличия от таковых у хлорина еб. Анализ спектров (рисунок 2) показывает, что ДМЭ Хеб является более гидрофобным соединением, чем хлорин еб. Однако также было замечено, что максимум в длинноволновой

области у ДМЭ Хеб смещен далее в красную область по сравнению с хлорином еб. Это может свидетельствовать о том, что при проведении фотодинамической терапии с ДМЭ Хеб есть гораздо большие перспективы по проникновению через ткани по сравнению с хлорином еб.

Значение pH буферного раствора практически не влияло на спектральные свойства ДМЭ Хеб (таблица 2). Только в фосфатном буферном растворе максимум в красной области спектра незначительно смещен в область с меньшими длинами волн. Поэтому в дальнейших исследованиях можно применять любой из используемых в данной работе буферных растворов.

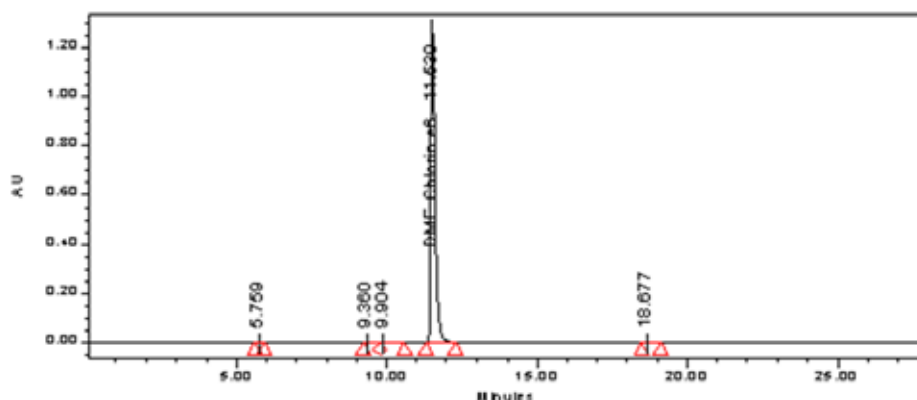


Рисунок 1 – Хроматограмма образца ДМЭ Хе6

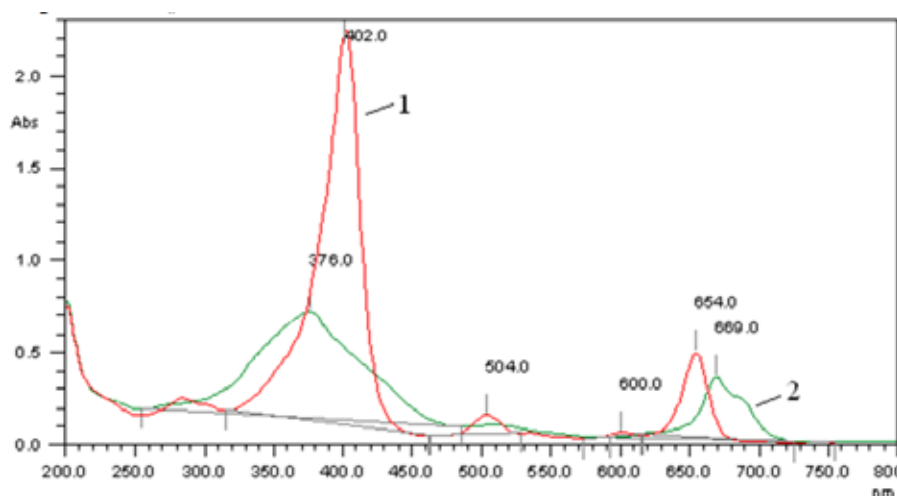


Рисунок 2 – Спектры поглощения хлорина е6 (1) и ДМЭ Хе6 (2) в буферном растворе Трис 7,4

Таблица 2 – Значения длин волн максимумов для образцов хлорина е6 и ДМЭ Хе6

Образец	Длина волны максимума, нм	
	Полоса Соре	Длинноволновая область спектра
Хлорин е6 в буферном растворе Трис 8,5	402	654
ДМЭ Хе6 в фосфатном буферном растворе с pH=6,4	376	668
ДМЭ Хе6 в буферном растворе Трис 7,4	376	669
ДМЭ Хе6 в буферном растворе Трис 8,5	377	669

Изучение поведения ДМЭ Хе6 в присутствии и отсутствии ПВП дало следующие результаты (рисунок 3). При сравнительно низком содержании ПВП, также как и при отсутствии высокомолекулярного компонента в испытуемых растворах (от 1:0 до 1:10), пики максимумов не имели типичной для пиков формы гауссового распределения, а также малой величины оптической плотности. Этот факт можно объяснить тем, что в растворах молекулы ДМЭ Хе6, вероятно, образуют димеры или даже олигомеры. Также данное явление

может быть связано с более высокой гидрофобностью ДМЭ Хе6. Кроме того, наблюдалось резкое смещение полосы Соре в область с меньшими длинами волн, сопровождающееся расщеплением пика.

Однако увеличение относительного содержания высокомолекулярного компонента (массовое соотношение ДМЭ Хе6:ПВП составляло от 1:100 до 1:5000) способствует образованию пиков с формой гауссового распределения. Это может свидетельствовать о том, что в испытуемых растворах может образовываться молекулярный ком-

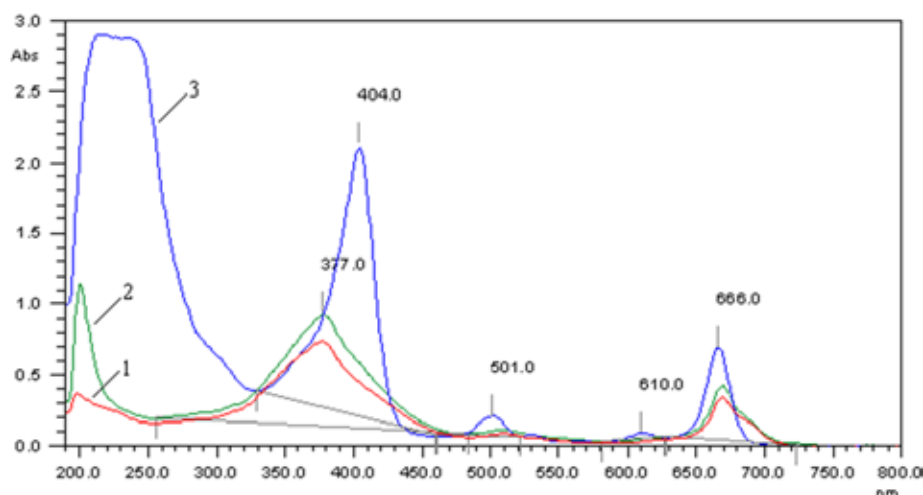


Рисунок 3 – Сравнение спектров поглощения образцов ДМЭ Хе6 с ПВП марки Пласдон С15 (молекулярная масса 10000) в соотношениях 1:0, 1:1 и 1:5000 в буферном растворе с рН=7,4

плекс ДМЭ Хе6 с ПВП, для которого необходимо достаточно большое относительное содержание высокомолекулярного компонента. Также наблюдалось заметное увели-

чение значений оптических плотностей, соответствующих максимумам, характерным для ДМЭ Хе6 (таблица 3). Дальнейший анализ таблицы 3 показал, что увеличение

Таблица 3 – Значения оптических плотностей растворов диметилового эфира хлорина е6 с поливинилпирролидоном различных марок и молекулярных масс в буферном растворе Трис 7,4

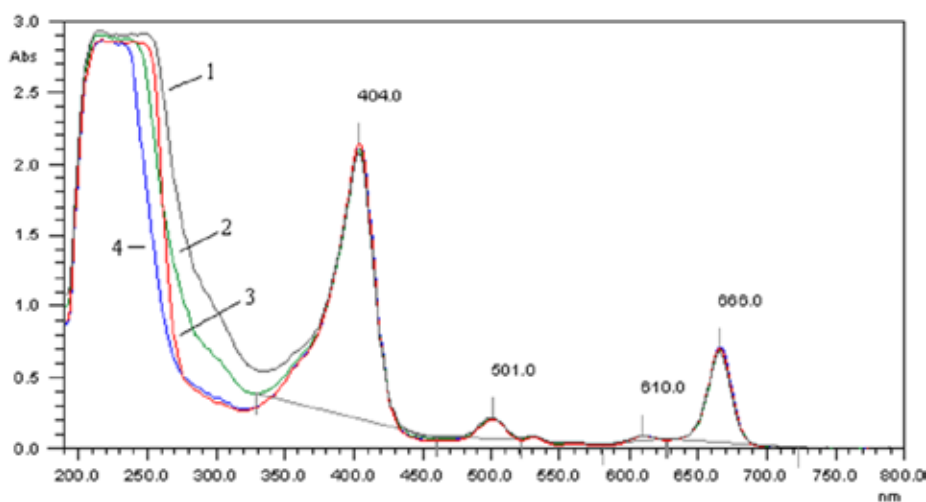
Образец ПВП (ДМЭ Хе6)	Соотно- шение ДМЭ Хе6:ПВП	Используемый буферный раствор					
		Буферный раствор Трис 8,5		Буферный раствор Трис 7,4		Фосфатный буферный раствор с pH=6,4	
		Значение оптической плотности					
		Полоса Core	Длинно- волновая область	Полоса Core	Длинно- волновая область	Полоса Core	Длинно- волновая область
ДМЭ Хе6	1:0	0,811	0,377	0,738	0,343	0,794	0,367
ПВП Пласдон C12	1:1	0,872	0,412	0,874	0,411	0,694	0,347
	1:10	0,919	0,438	0,985	0,458	0,759	0,377
	1:100	1,633	0,586	1,544	0,595	1,107	0,472
	1:1000	2,036	0,669	2,116	0,698	2,026	0,665
	1:5000	2,099	0,691	2,143	0,707	2,057	0,672
ПВП Пласдон C15	1:1	0,827	0,38	0,93	0,425	0,716	0,357
	1:10	0,996	0,458	1,086	0,48	0,74	0,389
	1:100	1,869	0,64	1,877	0,659	1,402	0,526
	1:1000	2,068	0,689	2,097	0,7	1,99	0,659
	1:5000	2,062	0,679	2,102	0,692	1,935	0,661
ПВП «Синтвитта» с молеку- лярной массой 12600±2700	1:1	0,885	0,402	0,971	0,437	0,734	0,368
	1:10	1,014	0,476	1,13	0,505	0,727	0,409
	1:100	1,896	0,648	1,943	0,671	1,546	0,564
	1:1000	2,06	0,685	2,137	0,717	2,047	0,683
	1:5000	2,099	0,694	2,081	0,679	1,919	0,631
ПВП Пласдон C25	1:1	0,947	0,41	0,968	0,433	0,772	0,376
	1:10	1,088	0,495	1,195	0,52	0,741	0,402
	1:100	1,855	0,629	2,015	0,695	1,664	0,584
	1:1000	2,052	0,687	2,127	0,717	2,019	0,672
	1:5000	2,088	0,7	2,144	0,719	2,159	0,718

относительного содержания высокомолекулярного соединения от 1:100 до 1:5000 незначительно влияло на спектральные свойства фотосенсибилизатора. Например, для образца ДМЭХ е6 с ПВП Пласдон С15 при увеличении относительного содержания ПВП от 1:1 до 1:100 происходило увеличение оптической плотности пика в длинноволновой области на 68%. С другой стороны, при увеличении относительного содержания ПВП от 1:100 до 1:5000 увеличение значения оптической плотности в этой же области спектра достигало всего 6%.

При изучении влияния молекулярной массы ПВП на спектральные свойства фотосенсибилизатора было обнаружено, что величина молярной массы практически не играла роли в изменении спектральных

свойств ДМЭ Хе6 (рисунок 4), в отличие от таковых для хлорина е6 [8]. Данное явление можно объяснить тем, что у макромолекулы ПВП с молярной массой 4000 уже имелось достаточно центров связывания с молекулами фотосенсибилизатора, и дальнейшее удлинение полимерной цепи практически не влияет на образование молекулярного комплекса. Согласно данному наблюдению, при разработке новых лекарственных средств на основе ДМЭ Хе6 достаточно использовать ПВП с молярной массой 4000, что будет способствовать большей безопасности и меньшей токсичности данных лекарственных форм.

Таким образом, факт смещения максимумов может свидетельствовать об образовании комплекса ДМЭ Хе6 с ПВП.



1 – с ПВП Пласдон С25, 2 – с ПВП «Синтвита» 12600±2700,
3 – с ПВП Пласдон С15, 4 – с ПВП Пласдон С12

Рисунок 4 – Сравнение спектров поглощения образцов ДМЭ Хе6 с ПВП различных марок и с различными молярными массами в соотношении 1: 5000 в буферном растворе с pH=7,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что спектральные свойства ДМЭ Хе6 в присутствии и отсутствии ПВП отличались от свойств для хлорина е6. Замечено, что в отсутствие высокомолекулярного компонента ДМЭ Хе6 является более гидрофобным соединением, чем хлорин е6, и в буферных растворах образует димеры и олигомеры. Присутствие в растворах с фотосенсибилизатором ПВП, начиная от стократного избытка, препятствовало процессам ди- и олигомеризации, а также способствовало образованию молекулярного комплекса.

2. Доказано, что молярная масса ПВП и pH буферного раствора слабо влияли

на спектральные свойства ДМЭ Хе6 в испытуемых растворах.

3. Полученные результаты показали, что использование ДМЭ Хе6 в комбинации с ПВП имеет перспективы получения новых лекарственных форм фотосенсибилизатора.

SUMMARY

S.L. Fiedaruk, T.V. Trukhacheva,
S.N. Sakalou, K.A. Fralenkou,
V.P. Kheidorov

THE STUDY OF SPECTRAL
PROPERTIES OF DIMETHYLESTER
OF CHLORIN E6 IN THE PRESENCE
OF POLYVINYLPYRROLIDONE

It was analysed different samples on the basis of dimethylester of chlorin e6 and different samples of polyvinylpyrrolidone by the method of UV–Vis spectrophotometry. The influence of ratio photosensitizer–polyvinylpyrrolidone was studied in different buffer solutions on spectral properties of dimethylester of chlorin e6. The obtained spectrums were also compared with those for chlorin e6 in the presence of polyvinylpyrrolidone. It was proved, that molar mass of high-molecular component has a weak influence on spectral properties of investigated substance. The received results demonstrate the decrease of effect of di- and oligomerization of photosensitizer molecules in the presence of high-molecular component, and the formation of complex of this substance with macromolecules of polyvinylpyrrolidone. Carried out investigations give a foundation for perspective of further investigations for the production of dosage forms on the basis of dimethylester of chlorin e6 and polyvinylpyrrolidone.

Keywords: photodynamic therapy, UV–Vis spectrophotometry, dimethylester of chlorin e6, polyvinylpyrrolidone.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spikes, J.D. New trends in photobiology (Invited review) chlorines as photosensitizers in biology and medicine / J.D. Spikes // *J. of Photochemistry and Photobiology, B: Biolog.* – 1990. – V.6. – P. 259 – 274.
2. Photolon an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience/ P. Petrov [et al.] / *Acta Bioptic Inform Med.* – 2004. – V.10. – P. 6 – 7.
3. Immediate and long-term efficacy and safety of photodynamic therapy with Photolon® (Fotolon®) – a seven-year clinical

experience / Y.P. Istomin [et al.] // *Proc. Of SPIE.* – 2009. – Vol. 7380. – P. 703806V1 – 703806V8.

4. Первый опыт клинического применения фотодинамической терапии в лечении васкуляризированных бельм роговицы / Ю.А. Белый [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2007. – Т. 6, №1. – С. 10.

5. Sapunov, V.V. Association of mono- and dimethyl ethers of chlorine e6 in ethanol-water solutions / V.V. Sapunov, G.A. Kochubeev // *J. of Appl. Spectroscopy.* – 2000. – Vol. 67. – P. 597 – 604.

6. Зорин, В.П. Распределение порфириновых сенсibilizаторов между белковыми и клеточными элементами крови / В.П. Зорин, И.И. Хлудеев, Т.Е. Зорина // *Биофизика.* – 2000. – Т.45, вып. 2. – С. 313 – 319.

7. Intra- and intermembrane distribution of chlorine e6 derivatives / V.P. Zorin [et al.] // *Proceedings SPIE (Photodynamic therapy II).* – 1994. – Vol. 2325. – P. 87 – 101.

8. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorine e6-polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction *in vitro* / H.A. Isakau [et al.] // *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2008. – V.92. – P. 165 – 174.

Адрес для корреспонденции:

220007, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Фабрициуса, 30,
РУП «Белмедпрепараты»,
тел.факс 8 (017) 380 00 36,
e-mail: lab659@yandex.ru,
or nfc@belmedpreparaty.com,
Федорук С.Л.

Поступила 26.08.2014 г.